

(19) KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

## KOREAN PATENT ABSTRACTS

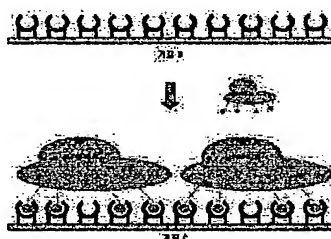
(11)Publication number: 1020020005085 A  
(43)Date of publication of application: 17.01.2002(21)Application number: 1020000038491  
(22)Date of filing: 06.07.2000(71)Applicant: BODITECH INC.  
(72)Inventor: KIM, JUN BAE  
KIM, TAE SEON  
MUN, JEONG DAE  
PARK, SANG YEOL

(51)Int. Cl C07K 17 /00

(54) PREPARATION METHOD OF BISCROWN-4 MONOLAYER BY CHEMICALLY BINDING THE BISCROWN-4 DERIVATIVES TO SOLID SUBSTRATES HAVING AMINE TERMINAL GROUPS AND PREPARATION OF PROTEIN MONOLAYERS USING THE SUBSTRATES

## (57) Abstract:

PURPOSE: A preparation method of biscrown-4 monolayer by chemically binding the biscrown-4 derivatives to the solid substrates having amine terminal groups and preparation of protein monolayers using the said substrates are provided, thereby easily and simply immobilizing the protein and effectively maintaining the activity of immobilized protein. CONSTITUTION: The protein mono layer described in figure 2 is produced by dipping slide glass in piranha solution( $H_2SO_4:H_2O_2=1:1$ ) at 80 deg.C for 1 hour; dipping the slide glass in second distilled water; washing the slide glass with second water and acetone and drying it; dipping an anhydrous toluene and 3-aminopropyltriethoxysilane solution at 25 deg.C for 1 hour; washing the slide glass and drying it at 120 deg.C for 30 minutes; dipping the slide glass in a solution of toluene and methanol for 2 minutes with sonification; washing it with methanol and drying it; dipping the slide glass in a biscrown-4 containing solution at 80 deg.C for 1 hour; washing the slide glass with toluene and dipping it a solution of toluene and methanol with sonification; and dipping the slide glass in a 1 micromol-1 nmol of protein solution for 30 minutes to 2 hours.



copyright KIPO 2002

## Legal Status

Date of request for an examination (20000706)

Notification date of refusal decision (00000000)

Final disposal of an application (rejection)

Date of final disposal of an application (20031113)

Patent registration number ( )

Date of registration (00000000)

Number of opposition against the grant of a patent ( )

Date of opposition against the grant of a patent (00000000)

Number of trial against decision to refuse (2003101001637)

Date of requesting trial against decision to refuse (20030423)

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(5) Int. Cl.  
C07K 17/00

(11) 공개번호  
(43) 공개일자

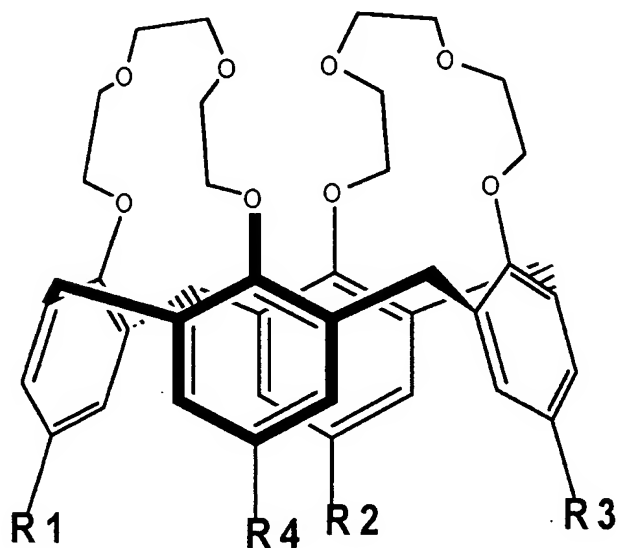
특2002-0005085  
2002년01월17일

(21) 출원번호	10-2000-0038491
(22) 출원일자	2000년07월06일
(71) 출원인	바디텍(주), 최의열 대한민국 200-957 강원도 춘천시 후평동 198-53 생물산업벤처지원 B-311
(72) 발명자	김태선 대한민국 200-702 강원도춘천시옥천동한림대학교화학과 문정대 대한민국 200-160 강원도춘천시후평동742번지16/6 김준배 대한민국 480-101 경기도의정부시가능1동368-46,16/2 박상열 대한민국 200-163 강원도춘천시후평3동세경4차403동304호
(77) 심사청구	있음
(54) 출원명	아민기가 부착된 고체기질에 비스크라운-4 유도체를 화학결합시켜 비스크라운-4단분자층의 제조법 및 이기질을 이용한 단백질 단분자층의 제조방법

요약

본 발명의 목적은 하기 화학식 1과 일치하는 화합물을 이용하여 그림1과 같은 고체기질을 제조하고 이를 이용하여 그림 2와 같은 항원, 항체, 효소 등의 단백질을 고정화한 단백질 단분자층의 제조이다.

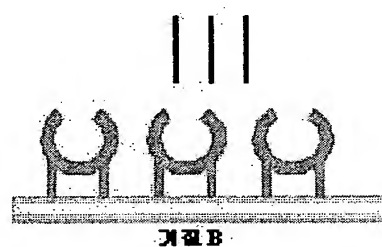
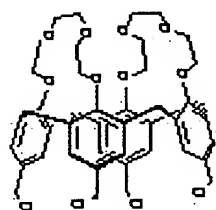
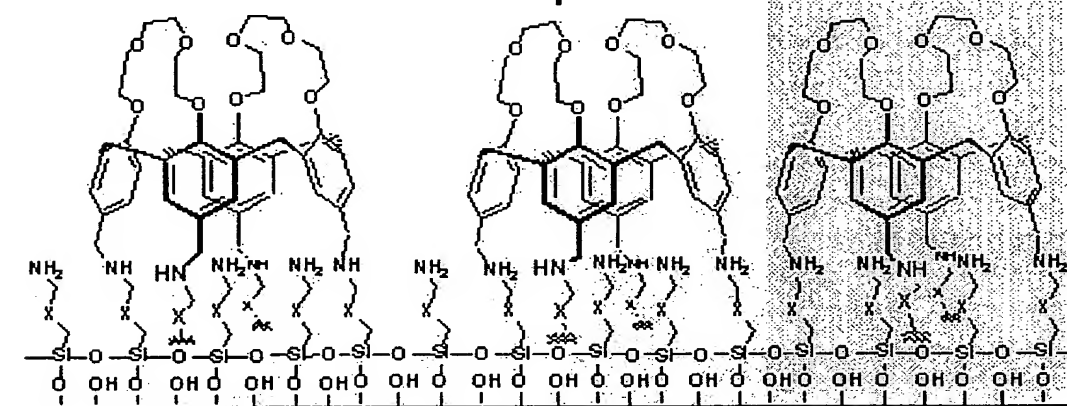
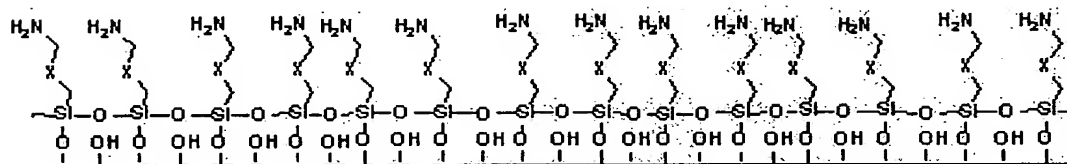
[ 화학식 1 ]



R1, R2, R3, R4, = -CH<sub>2</sub>Cl

명명 : 1,2,3,4-tetrachloromethylcalix[4]arene-biscrown-4

화학식 1을 일반적으로 명명할 때 biscrown-4 화합물이라 한다.



---

2



그림 1은 유리기질을 biscrown-4 화합물이 부착될수 있는 아민말단기를 가진 화합물을 이용하여 표면을 변성시키는 것을 말한다. 기존에 알려진 방법에 따라

(ref. J. W. Park, Langmuir vol 13, 4305 (1997), T. J. Marks, Langmuir vol 12, 5338 (1996)) -OH기가 풍부한 유리기질을 아민 말단기를 가지게 한다음 이 아민 말단기를 biscrown-4 화합물과 반응시켜 공유결합에 의해 biscrown-4 화합물을 유리 기질위에 고정시켜 biscrown-4 화합물의 단분자층을 생성시키는 개략도이다.

[ 그림 2 ]

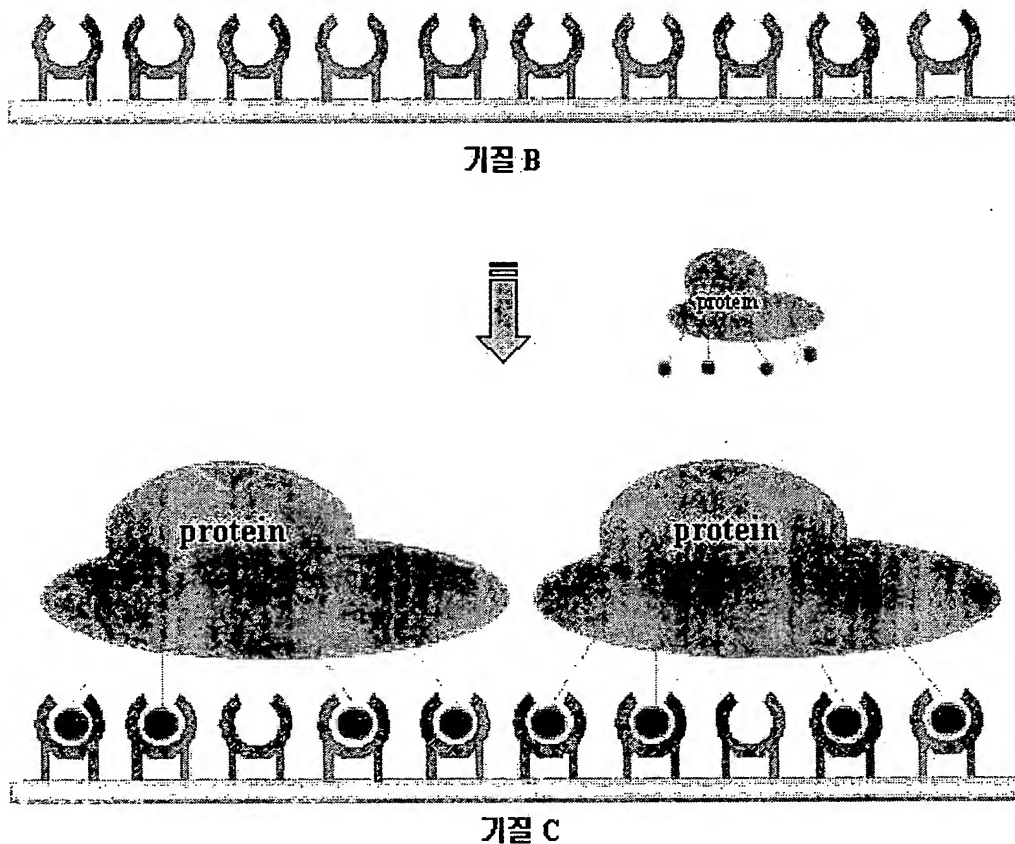


그림 2는 그림 1에서 제조된 biscrown-4 단분자층에 단백질이 크라운 고리에 자발적으로 인식되어 단백질 단분자층이 유리 기질위에 생성되는 개략도이다. 이 경우 단백질의 외벽에 많은 암모늄기( $-\text{NH}_3^+$ )가 biscrown-4 화합물의 크라운 고리에 인식되어 다중 이온인식에 의한 항원, 항체, 효소등의 단백질의 자발적인 고정화 반응을 나타내고 있다. 이 과정은 단백질이 적절한 농도로 녹아 있는 용액에 그림1에서 제조된 biscrown-4 단분자층 기질을 담구면 자발적인 인식작용에 의해 10분에서 1시간 이내에 표면이 완전히 단백질로 덮인 단백질의 단분자층이 형성된다. 완전한 단백질의 단분자층이 제조되었다는 것은 원자힘 현미경을 사용한 표면분석을 통하여 알아낼 수 있다. 또한 고정화된 단백질의 농도나 활성이 기존의 면역진단법에서 사용되는 분석방법과 직접적으로 비교하여 그 분석한계농도의 차이를 알아낼 수 있다. 그 실험 결과는 아래의 그림 3에 나타나 있다.

[ 그림 3 ]

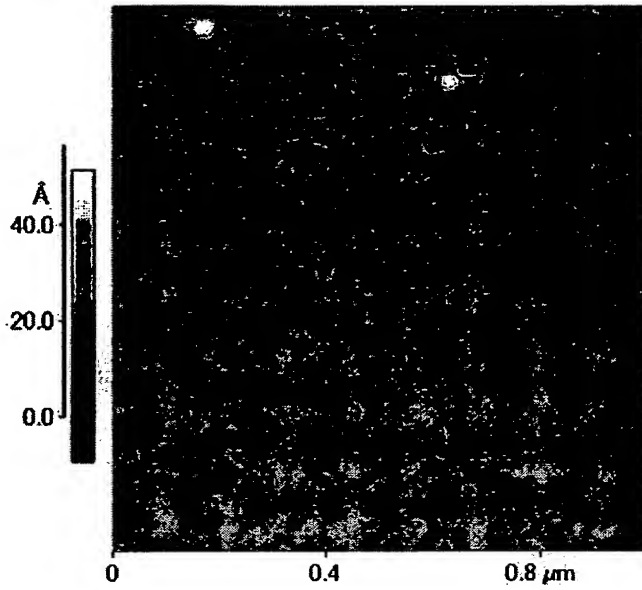


그림 3-1

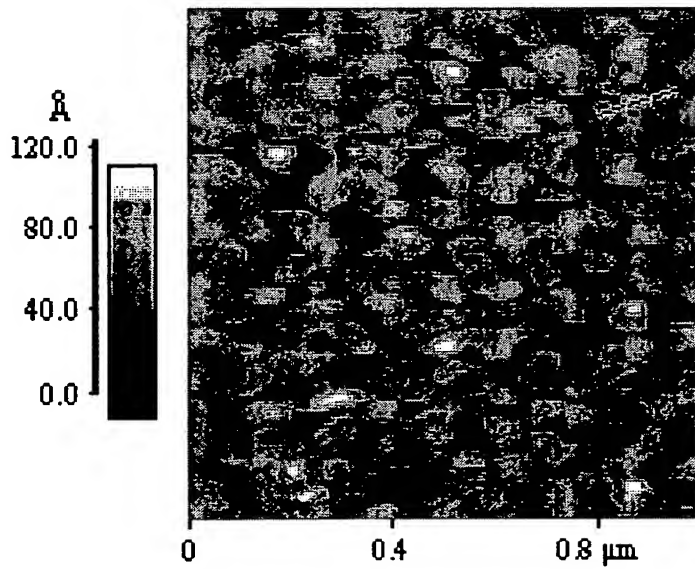


그림 3-2

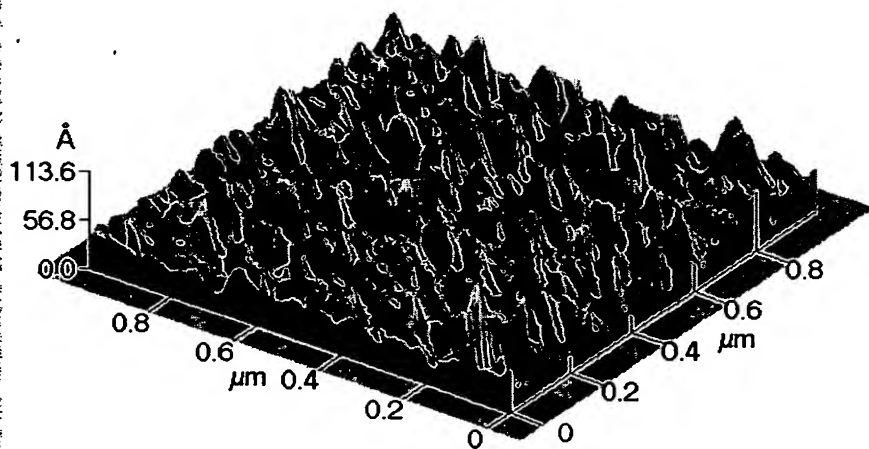


그림 3-3

그림 3-1은 유리기질의 표면 이미지이고 3-2는 biscrown-4 단분자층에 단백질이 고정화되어 제조된 단백질 단분자층의 이차원적 이미지이고 이를 3차원적인 이미지로 나타낸 것이 그림 3-3이다. 각각의 실험결과는 동일한 기질로부터 얻어졌으며 그림 3-1과 3-3을 비교해 보면 두 기질의 표면에 단백질이 빈자리 없이, 대단히 균일하게 표면을 가득채운 상태로 고정화 되었다는 것을 알 수 있다. 또한, 그림 3-3에서 보듯이 각각의 단백질들 간의 높이차이가 단백질 분자한개만큼은 되지 않는 것으로 보아 단백질이 단백질위에 물리적으로 흡착되어 붙어있는 단백질 이중층은 생성되지 않는다는 것을 알 수 있다. 이 결과는 이번에 발명된 biscrown-4 단분자층이 단백질을 고정화 하는데 빈자리 없이 표면을 가득 메워 기존의 표면의 빈자리에 필수적으로 수반되는 이중단백질의 피흡착을 막기 위하여 blocking agent를 사용할 필요성이 없어져서 전체면역진단법에서 시행단계를 대폭적으로 감소시킴을 물론 실험단계에서 필수적으로 나타나는 단백질의 활성강소를 최소화 할 수 있다는게 이 발명의 큰 장점이자 독창성이라 할 수 있다.

[ 그림 4 ]

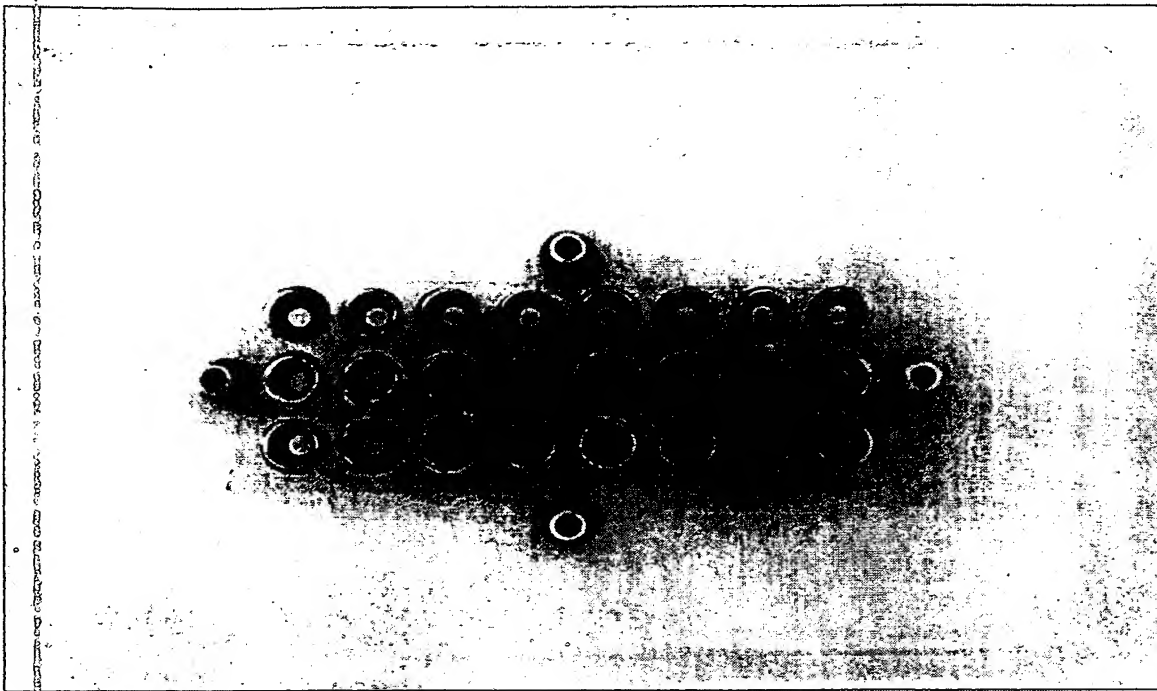


그림 4-1. 아크릴로 만든 biscrown-4 키트



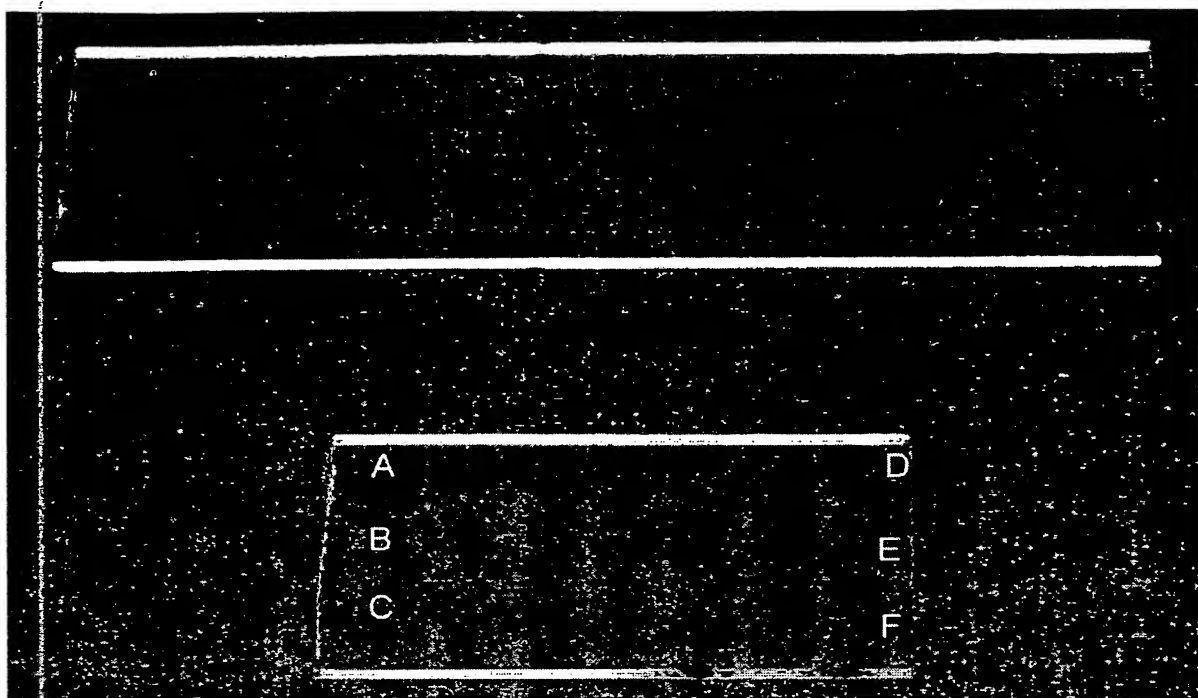


그림 4-2 mouse IgG를 이용한 면역진단법 결과

mIgG 농도	10 $\mu$ g/ml	1 $\mu$ g/ml	0.1 $\mu$ g/ml	0.05 $\mu$ g/ml	0.01 $\mu$ g/ml	1ng/ml
절대양	100ng	10ng	1ng	0.5ng	0.1ng	10pg
나이트로셀룰로스 기질	+	+	+	-	-	-
폴리스틸렌 기질	+	+	+	+	-	-
유리(biscrown-4)기질	+	+	+	+	+	-

## 그림 4-3

그림 4-3는 그림 1,2에 따라 제조된 단백질 단분자층과 기존에 사용되어진 고체기질에서의 단백질 단분자층을 임상진단법에 따라 활성비교 및 측정 한계치를 비교한 실험 결과이다. 그림 4-1은 기질을 작은 점(spot)에서 측정할 수 있게 제조된 키트이고 그림 4-2는 biscrown-4 단백질 단분자층의 실제 실험결과를 디지털 카메라로 찍은 결과이다.

그림 4-3은 서로 다른 세개의 기질에 같은 양의 항 마우스 면역글로불린(IgG) 항체를 고정화 시키고 서로 다른 농도의 마우스 면역글로불린과 반응시킨 뒤 효소표지를 단 항 마우스 면역글로불린 항체와 반응시킨다. 반응이 완료되면 일정량의 발색 시약을 가하여 색 변화를 관찰한 것이다. 이 실험을 통해서 각각의 기질에 따라서 표면에 고정화되는 마우스 면역글로불린의 측정한계치를 비교해 보면 나이트로셀룰로우스 기질에서 1ng이 나왔고 폴리스틸렌 기질의 경우는 0.5ng으로 높았으나 biscrown-4 기질의 경우는 이보다 훨씬 높은 0.1ng이 나왔다. 이러한 높은 민감도는 이전에 측정할 수 없었던 혈액에서의 극 소량의 항원을 측정할 수 있게 되어 질병의 조기 감지에 이용될 수 있다.

## 색인어

'유리기질, 단백질 고정화, 이온인식, 임상진단, 면역측정법'

## 영역서

## 발명의 상세한 설명

## 발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 20KD이상의 분자량을 가진 단백질을 표면에 단분자층으로 제조 할 수 있는 새로운 기질의 개발과 고정화 고정개발 및 기질 제조 방법 개발로 요약할 수 있다.

효소, 항원, 항체 등의 단백질을 고체기질에 고정화하는 방법은 면역학, 생화학, 임상화학 등의 생명과학 전 분야에서 특정 단백질을 분석하는 가장 기초적인 기반기술이다. 특히 면역효소탐지법으로 알려져 있는 ELISA(Enzyme Linked Immuno Sorbent assay)법은 양, 종양, 및 특정 질환 등을 탐색할 수 있는 가장 효과적인 도구로 널리 사용되고 있으며 다양한 종류의 진단 키트로서 판매되고 있다.

단백질의 표면 고정화 반응은 주로 고분자 기질(polystyrene, polyvinylchloride)이나 나이트로셀룰로스(nitrocellulose) 기질 표면에 물리흡착 방식을 통해 수행되고 있고 최근에는 화학반응을 이용하여 단백질과 기질표면 사이에 탄소 결합을 형성하여 표면 고정화 반응을 한다. 또 고체기질 위에 biotin을 부착한 뒤 이 biotin층 위에 avidin이나 streptoavidin을 화학결합 방식에 의해 부착하고 다시 biotin이 부착된 단백질을 이용하여 상충분자층에 의한 단백질 고정화반응이 발표되기도 하였다.(Science, 1993년 Vol 262, pp 1706-1708) 그러나 위와 같은 단백질 고정화 방법 등은 다음과 같은 문제점을 가지고 있다.

1. 농도 : 기존에 알려져 있는 단백질의 고정화 반응에서 가장 문제가 되는 것은 표면에 고정화된 단백질의 양이 상당히 낮다는데 있다. 낮은 농도에서는 이중단백질이 고체기질 표면의 빈자리에 비특이적인 고정화반응을 하여 실험결과에 심각한 오차(위양성)를 나타낼 수 있다. 그러므로 이러한 빈 공간의 반응성이 없게 blocking agent를 사용하여 막아버리거나 단백질이 붙을 수 없게 화학적인 처리를 하여야 한다고 알려져 있으나 이러한 처리 과정에서 부착된 단백질 분자의 활성이 떨어질 수도 있다. 또 기존 방법은 기질 표면에 고정화된 단백질의 양이(농도)매우 낮기 때문에 극미량의 특정 단백질을 확인하는데 있어서 불가능한 경우도 있을 수 있다. 그러므로 농도, 즉 단위면적당 표면에 고정화되는 단백질의 양이 많으면 많을수록 분석이 정정 쉬워지기 때문에 고정화 된 단백질의 양이 최대화된 단백질 단분자층개발을 지금까지 많은 연구진에서 수행하였으나 아직 만족할만한 결과는 발표된 것이 없다. 이번 발명에서는 고체기질의 전체표면이 특정 단백질로 부착된 단백질 단분자층의 제조 방법을 개발하여 고체기질에 남아있는 빈 공간을 최소화하고 이중 단백질의 비특이적 부착을 제거하였다. 이러한 제조된 단백질 단분자층은 농도 문제와 비 특이성 고정화 반응 등에 대한 두가지 문제를 동시에 해결하는 발명이다.

2. 활성 : 단백질이 기질 표면에 고정화되면 수용액상에서 보다 더 쉽게 활성을 잃어버리는 경우가 많은데 이는 단백질이 고체기질에 고정화될 때 화학결합 혹은 표면에서의 물리흡착에 의해서 너무 강하게 표면으로 당겨져서 활성위치의 변성이 일어나기 때문으로 알려져 있다. 본 발명에서는 화학결합으로 이루어지는 기존의 고정화 반응과는 확연히 구분되는 분자간 인력을 이용한 이온인식에 의해 상대적으로 약하게 고정화반응이 수행됨으로써 표면에 끌리는 물리흡착 혹은 화학결합에 의한 활성감소가 상대적으로 낮게 나타났다. 실제로 표면에 고정화되는 단백질의 양은 기존 방법보다 2배 이상 높게 나타나는 것으로 추정되며 실제의 활성은 훨씬 큰 10배 정도의 차이를 보이고 있다.

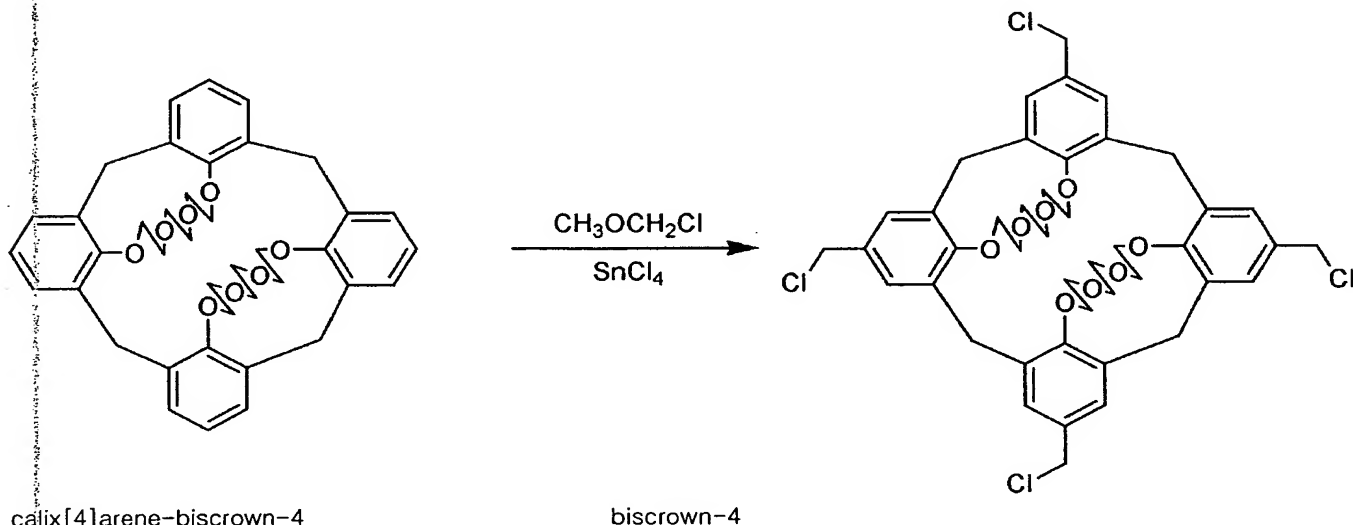
실제로 그림 4에서 보여지는 것과 같은 비교실험을 하여 본 발명에서 제조된 항체 단분자층이 기존의 방식과 비교하여 같은 면적과 같은 실험 방식을 사용하였을 때 측정 한계치가 최대 10배 이상 증가하는 결과를 얻었다. 이 결과는 이번 발명에 제시된 단백질 고정화용 기질에 고정화된 단백질의 활성이 기존의 방식에 비해 획기적으로 개선된 제조법이라는 것을 증명한다.

## 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 분자량이 20,000(20KD) 이상의 항원, 항체, 및 효소 등의 단백질 분자를 고체기질에 화학식 1에 도식화 되어있는 biscrown-4 화합물의 크라운 고리를 이용하여 단백질의 활성위치의 반대쪽에 다량 분포하는 양모늄기 등의 양이온을 인식하여 다중 이온인식에 의한 단백질 고정화 방법의 개발

이다. 이 발명에서 기술하는 고정화 방법은 기존의 단백질 고정화 반응에서 사용하여 왔던 단백질 분자의 화학적인 처리나 유전공학적인 변환없이 분자인식작용중 하나인 이온인식작용을 이용하여 단백질을 고체기질의 표면에 간단히 고정화시켜 고체기질위에 단백질 분자가 다른 단백질분자가 고정화 될 수 없을 만큼 빽빽하게 들어차있는 단백질의 단분자층을 제조하는 기술의 개발이다. 이러한 목적 달성을 위하여 이 발명에서는 이러한 기술 개발에 필수적인 단백질의 양모늄기를 인식할 수 있는 인식기를 가진 biscrown-4 화합물을 유리등의 -OH 작용기가 외부로 나와 있는 고체 기질에 화학결합시키는 합성방법 및 모든 종류의 단백질을 아무런 화학적 혹은 유전공학적인 변형없이 표면에 자발적으로 인식되어 이중단백질이 물리적 흡착에 의한 고정화를 일으킬 수 있을만한 크기의 빈 자리를 남기지 않는 단백질 단분자층의 제조를 기존에 사용되던 단백질 고정화 반응보다도 간편하고 단시간내에 제조를 완성하였으며 고정화된 단백질의 활성이 뛰어나며, 면역학 및 임상의학등에서 항원등의 존재를 확인할때 사용되는 면역측정법에서 필수적인 특이 단백질의 분석시 분석방법을 획기적으로 간편화 시킬 수 있게 단백질이 표면을 이중 단백질이 고정화 될만한 빈자리없이 밀집되에 단백질이 이온인식이라는 약한 분자간 인력에 의해 고정화 되는 단백질 단분자층의 제조에 필수적인 biscrown-4기질제조법 및 필수적인 아민 말단기를 가진 고체기질의 개발과 단백질 단분자층의 제조 방법개발이다.

#### [(본 발명에 따른) 실시예 1]



건조된 용기에  $\text{CHCl}_3$  20 mL을 넣고 ice bath로 차게하며 질소 교류하에 교반시켜준다. 이 용기에  $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{Cl}$  0.468ml (6.16mmol)을 넣고 2분 정도 지난 뒤  $\text{SnCl}_4$

0.577ml (4.93mmol)을 3~4분에 걸쳐 천천히 넣어 준다 .

15분 뒤에 calix[4]arene-biscrown-4(CABCR-4) 100mg(0.154mmol)을  $\text{CHCl}_3$ 에 녹여 천천히 가한다. 5분뒤에 ice bath를 제거하고 상온으로 온도를 올리면서 한시간 동안 반응시킨다. 반응용액에  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 를 가하고 희석시킨 뒤 얼음을 넣어 차가운 상태에서 교반하며 여분의  $\text{SnCl}_4$ 를 제거한다. 유기층을 분리한 뒤 차가운 DI(deionized) water로 2번 씻어 준다. 건조제를 넣어 건조시킨 뒤 건조제를 제거하고 용매를 감압증류하여 제거한 뒤 결과물 TCCABCR-4 (102mg, 80% 수율)을 수득하였다.

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$ 6.75-6.53(8H, m), 4.98(2H, d,  $J = 13\text{Hz}$ ,  $\text{ArCH}_2\text{Ar}$ ),

4.36-4.16 (18H, m,  $\text{ArCH}_2\text{Ar}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}$ ), 3.89-3.67 (16H, m,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.22 (2H, d,  $J = 13\text{Hz}$   $\text{ArCH}_2\text{Ar}$ ) and 3.12 (2H, d,  $J = 13\text{Hz}$ ,  $\text{ArCH}_2\text{Ar}$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$ 156.5, 135.6, 134.4, 128.8, 73.5, 70.9, 70.2( $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ), 46.6( $\text{CH}_2\text{Cl}$ ), 31.1, 29.8( $\text{ArCH}_2\text{Ar}$ )

#### [(본 발명에 따른) 실시예 2]

##### 기질 A 제조법 (그림 1)

유리(슬라이드 글라스)를 piranha 용액( $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2=1:1$ )에서 80도의 온도를 유지시키며 유리끼리 서로 겹쳐져 불지 않은 상태에서 1시간 동안 담가 두었다가 유리를 빼서 2차 증류수에 담가 주었다가 꺼내어 2차 증류수로 닦고 다시 아세톤으로 닦아 준 뒤 질소가스를 불어주면서 건조시킨다. 이 기질을 무수 톨루엔 200mL 3-아미노프로필트리에폭시실란(3-aminopropyltriethoxysilane) 1.7g을 녹이고 (톨루엔을 용매로 38mM 용액) 이 용액에 위에서 닦은 깨끗한 유리를 담그고 25도의 온도에서 유리끼리 서로 겹쳐져 불지 않은 상태에서 1시간동안 둔다. 이 유리를 톨루엔으로 씻은 다음에 120도의 온도가 유지되는 오븐 안에서 30분 가량 놓아 둔다. 다시 이 물질을 톨루엔과 메탄올 혼합용액(톨루엔:메탄올=1:1)에 담그고 2분동안 초음파진동시킨다. 다시 메탄올로 씻어주고 질소가스로 건조시킨다.

##### 기질 B 제조법 (그림 1)

기질 A를 톨루엔 70mL에 biscrown-4, 177mg이 녹아 있는 용액에 (톨루엔 용매로 3mM 용액)담그고 80도의 온도를 유지시키며 1시간동안 반응시킨다. 이 기질을 톨루엔으로 닦은 뒤 톨루엔:메탄올=1:1혼합용액에 담그고 초음파진동을 10초씩 3번 가량 시킨다. 이 기질을 메탄올로 닦고 2차 증류수로 뒤 0.1M 염화나트륨( $\text{NaCl}$ ) 수용액에 담그어 보관한다.

##### 단백질 단분자층 제조법 (그림 2, 기질 C)

기질 B를 단백질 코팅시 2차 증류수로 닦고 1micromol-1nmol 농도의 단백질 수용액에 30분 -2시간 동안 담근 뒤 2차 증류수로 닦으면 단백질 단분자층이 제조된다.

[(문 발명에 따른) 실시예 3]

기질 C와 기존에 사용되고 있는 방법을 이용한 면역측정법의 비교 실험

기존방법 1- 나이트로셀룰로소기질을 이용한 기질D 제조 방법

(re. Ed harlow, Antibodies (A laboratory manual),1988:Dot blot 방법)

1. 나이트로셀룰로소기질을 알맞는 크기로 잘라낸 다음 항 마우스 면역글루불린 항 체가 200 $\mu$ g이 녹아 있는 인산염 완충신염수(PBS)에 담그어 60분동안 상온에서 흡착시킨다.

2. 흡착이 완료되면 PBS-0.3%트윈 완충용액으로 세 번 세척한다.(각 각 5분간)

3. 세척이 완료되면 표면에 비 특이적인 반응을 억제하기 위하여 블로토(Blotto:트윈 완충용액으로 제조한 1% fish gelatin용액)용액에 1시간동안 상온에서 담근 뒤 씻어내면 기질 D가 제조된다.

기존 방법 2- 폴리스틸렌기질을 이용한 기질E 제조방법

(re. Ed harlow, Antibodies (A laboratory manual),1988:ELISA 방법)

1. 96 well(구멍) plate에 1 $\mu$ g/ml의 항 마우스 면역글루불린 항체 50 $\mu$ 씩 각 각의 구멍에 넣고 37도에서 한시간 동안 흡착시킨다.

2. 각 구멍마다 200 $\mu$ 의 PBS-0.3%트윈 완충용액으로 세 번 세척한다.(각 각 5분간)

3. 세척이 완료되면 표면에 비특이적인 반응을 억제하기 위하여 블로토용액을 각 구멍당 200 $\mu$ 씩 넣고 37도에서 1시간동안 둔뒤에 PBS-0.3% 트윈 완충용액으로 세 번 세척하면 기질E가 제조된다.

비교실험-(기질 C, D, E)

실험방법은 위에서 각각 제조된 biscrown-4단분자층에 제조된 단백질 단분자층(기질C)과 나이트로셀룰로소에 단백질이 고정화된 기질(기질D)과 폴리스틸렌에 단백질이 고정화된 기질(기질E)을 아래와 같은 조건에서 실험한다. 기질C와 기질D는 그림 4-1에서 보여지는 아리알 키드로 고정시켜 실험하였다. 키트는 아릴알판에 구멍을 내어 각 각의 층을 분리하였으며 슬라이드 글라스등이 깨지지 않고 완전히 밀착시키기위해서 각 층을 바이톤(viton)-오링을 사용하여 표면에 밀착시켰다.

1. 기질 C, D, E로 만든 키트 각 각의 구멍당 농도가 10ng/ml, 5ng/ml, 1ng/ml, 0.5ng/ml, 0.1ng/ml인 마우스 면역 글루불린 항체를 10 $\mu$ 씩 넣고 하나는 음성 대조군으로 PBS-0.3%트윈만 넣는다.) 37도에서 1시간동안 반응시킨다.

반응이 완료되면 각각의 구멍에 PBS-0.3%트윈 완충용액을 100 $\mu$ 씩 세 번 세척한다.

2. 세척 후 농도가 100ng/ml인 효소 표지 항 마우스 면역 글루불린 항체를 50 $\mu$ 씩 각각의 구멍에 넣고 37도에서 1시간 반응시킨다.

3. 각각의 구멍에 PBS-0.3%트윈 완충용액을 100 $\mu$ 씩 세 번 세척한다.

4. 이상의 과정은 세가지 기질 모두에 공통적으로 적용한다. 발색시에는 기질 C, E는 KBL사 substrate solution시약을, 기질 D는 BCIP+NBT시약을 각 구멍당 50 $\mu$ 씩 넣고 색 변화를 관찰한다. 실험 결과는 아래 도표 1, 2에 나타나 있다.

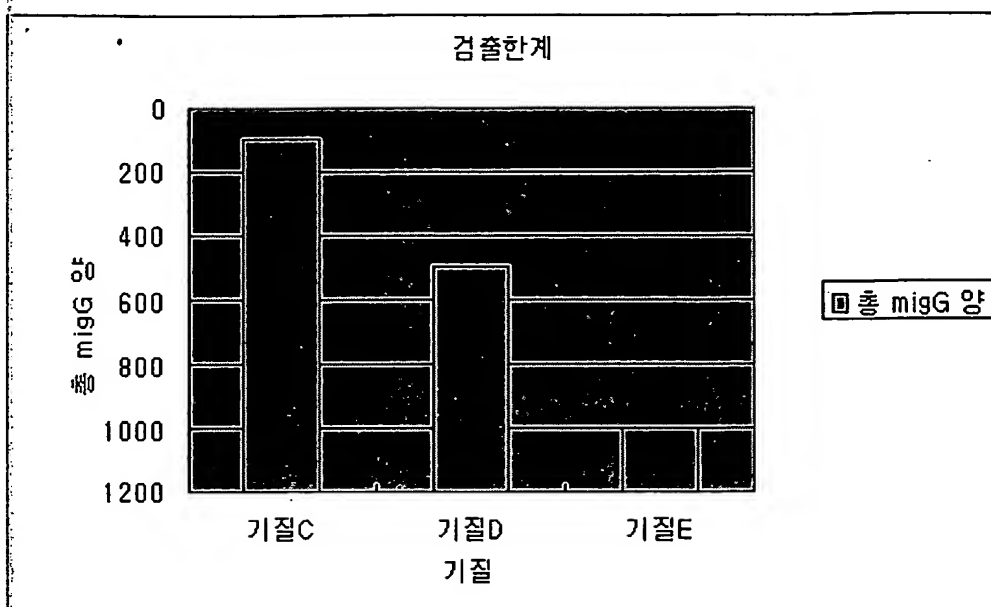


도표 1

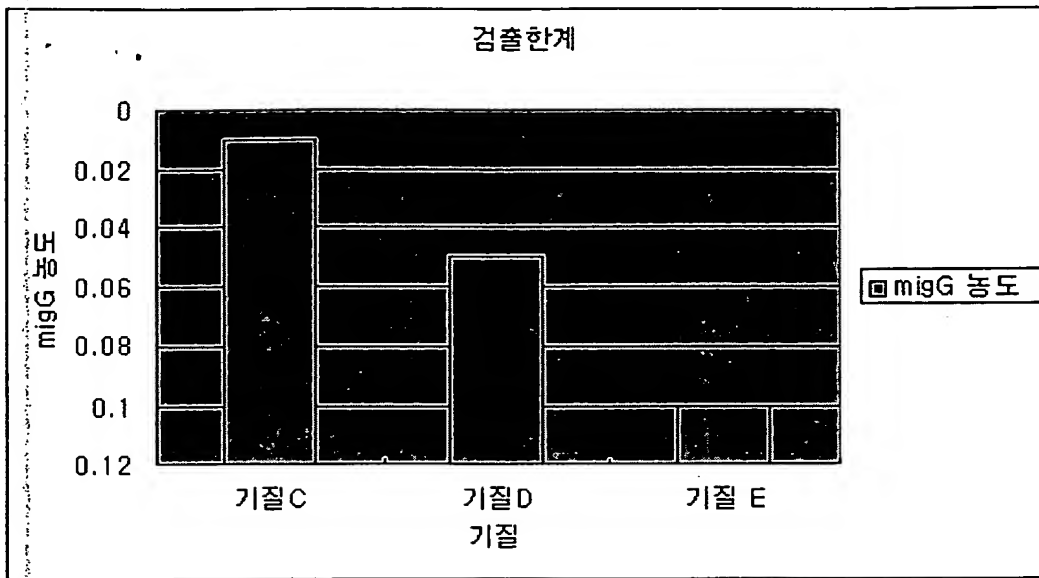


도표 2

## 발명의 구성 및 작용

본 발명은 이온인식이라는 새로운 개념을 이용하여 단백질을 고체기질에 고정화 시키는 제조법의 개발로서 다음과 같은 부분으로 구성된다.

1. 유리등의 -OH 작용기를 가진 고체기질에 단백질분자가 고정화 되는데 필요한 인식위치를 제공하는 biscrown-4 화합물을 화학결합하는데 필수적인 아민 말단기를 부착하는 그림 1과 같은 다양한 기질의 개발과 이 기질에 biscrown-4 를 화학적으로 고정화시킨 기질의 개발

유리등의 -OH 기를 표면에 가진 고체기질을 piranha용액( $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2=1:1$ )에서 80도의 온도를 유지시키며 기질끼리 서로 겹쳐져 붙지 않는 상태에서 1시간 동안 담구어 두었다가 빼서 2차 증류수에 담구어 둔 뒤 다시 2차 증류수와 아세톤으로 씻어 준 뒤 질소가스를 불어서 건조시킨다. 이 기질을 즉시 무수 톨루엔 200ml에 3-아미노프로필트리에톡시실란(3-aminopropyltriethoxysilane)등의 아민 말단기를 가진 화합물의 혼합물에 넣어 25도의 온도에서 기질끼리 서로 겹쳐지지 않은 상태에서 1시간동안 둔다. 이 기질을 톨루엔으로 씻은 다음에 120도의 온도가 유지되는 오븐안에서 30분 놓아둔다. 다시 이 기질을 톨루엔과 메탄올의 혼합용액(톨루엔:메탄올=1:1)에 담그어 2분동안 초음파진동(sonication)시킨다. 다시 메탄올로 씻어주고 질소가스로 건조시키면 아민 말단기를 가진 고체기질(기질A)이 제조된다.

기질 A를 무수 톨루엔에 biscrown-4가 녹아 있는 용액에 (톨루엔을 용매로 사용)담그고 80도의 온도를 유지시키며 1시간동안 반응시킨다. 이 기질을 톨루엔으로 닦은 뒤 톨루엔:메탄올 = 1:1 혼합용액에 담그고 초음파진동을 10초씩 3번 가량 시킨다.기질을 메탄올로 닦고 2차 증류수로 씻어서 biscrown-4 단분자층(기질B)을 제조 한다.

2.biscrown-4 단분자층에 단백질을 자발적인 고정화를 시켜 단백질 단분자층을 제조하는 방법

위에서 제조한 biscrown-4 단분자층을 분자량이 20KD이상의 단백질이 nmol~micromol의 농도로 들어있는 단백질용액에 넣은 뒤 1시간에서 2시간 가량 뒤에 빼어내면 단백질 단분자층의 제조가 완료된다. 이때 단백질이 녹아 있는 완충용액의 이온 농도가 낮을수록 더 빠르고 빈 자리 없는 단분자층이 생성된다. 제조된 단백질 단분자층은 원자힘 현미경을 사용하여 고정화된 표면을 관찰하였으며(그림 3) 고정화된 단백질의 활성은 기존방식과의 비교실험을 통해 관찰하였다. 그림 3은 biscrown-4 단분자층위에 생성된 단백질 단분자층과 사용한 고체기질의 하나인 유리(슬라이드 글라스)기질의 표면과의 차이를 나노미터 수준에서 확인한 AFM 이미지이다. 유리기질의 표면과 비교하면 표면에 단백질 분자들이 자리잡고 있음을 볼수 있으며 다른 단백질분자가 들어갈만한 크기의 빈 자리가 없이 완전한 단분자층을 이루고 있음을 보여준다. 또 높이의 변화를 보면 단백질이 거의 한층으로만 이루어져 있고 그위에 다른 단백질이 올라가 있을 때 예상되는 5나노미터 이상의 높이차가 나는 곳이 보이지 않는 것으로 보아 단백질 단분자층위에 같은 종류의 단백질이 물리 흡착에 의해 이중층의 형태로 올라가 있는 현상을 보이지 않는 거의 완전한 단백질 단분자층이 제조되었음을 보여주고 있다. 이는 biscrown-4 단분자층에서 이온 인식력을 보이는 크라운 고리의 특성에 의해 단백질의 암모늄기가 인식될 때에만 단백질분자의 고정화가 진행되고 적절한 크기의 공간이 더 이상 남지 않을 때에는 단백질이 고체 기질의 표면에 접근할 수가 없어 단백질의 고정화가 더 이상은 진행이 되지 않는다. 또한 고정된 단백질 단분자층위에는 단백질이 피흡착도지 않음을 알 수 있다.

그림 4 는 이 발명에서 개발된 단백질 단분자층제조법에 따라 제조된 단백질 단분자층에 고정된 단백질은 기존의 방식에 따라 고정화된 단백질에 비해 대단히 높은 활성을 나타내는 것이 그림 4-2.4-3에서 보여지고 있다. 나이트로 셀룰로우스 기질과 폴리스틸렌 기질은 같은 실험방법을 따라서 진행하면 약 5배에서 10배 가량 높은 검출한계(detection limit)를 보여주고 있다.

#### 발명의 효과

본 발명은 기존의 단백질 고정화 방법으로 사용되던 화학결합방식이나 물리 흡착방식등에서 나타났던 문제점을 이온 인식이라는 분자간 인력을 이용한 새로운 단백질 고정화 반응에 필요한 기질을 개발한 것이다.이 방식은 단순히 biscrown-4 단분자층을 가진 고체기질을 고정화 시킬 단백질 수용액에 담그어 두기만 하면 1시간 정도에 분자량이 20,000(20KD)이상의 모든 종류의 단백질을 활성을 기존방식에 비해 높게 보존된 상태로 이중단백질이 고정화될 수 있는 공간을 남기지 않을 만큼 밀집되게 부착할 수 있다. 이 발명은 기존의 단백질의 고정화 반응에서 문제가 되어왔던 비특이성 단백질의 흡착에 의한 고정화를 유발하던 고체기질의 빈 공간을 최소화 함으로 기존의 고정화 반응에서 큰 문제점인 농도 문제를 해결하는 동시에 비 특이성 단백질의 고정화를 억제하기 위하여 필수적으로 사용하여야 했던 blocking agent의 사용을 억제하여 시간과 고정화된 단백질의 활성유지를 획기적으로 개선하는 기질의 제조법이다. 이 방식은 고정화된 단백질을 이용하는 모든 종류의 실험에 기반이 되는 발명으로 사료된다.

#### (5) 청구의 범위

##### 청구항 1.

그림 1, 2와 같이 -OH 표면작용기를 가진 고체기질을 아민알단기를 가진 고체기질체로 제조하여 이를 화학결합에 의한 biscrown-4 단분자층 제조법

##### 청구항 2.

그림 3과 같이 biscrown-4 단분자층에 자발적인 단백질의 인식에 의한 단백질의 고정화에 의해 생성되는 단백질 단분자층 제조

##### 청구항 3.

이발명에 따라 제조된 단백질 단분자층을 이용한 임상진단으로의 응용

##### 청구항 4.

그림 1의 biscrown-4 화합물

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINE(S) OR MARK(S) ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**